

ЗДАТНІСТЬ ДО УТВОРЕННЯ КОЛОНІЙ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ КІСТКОВОГО МОЗКУ В КУЛЬТУРІ *EX VIVO* ХВОРИХ НА МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНИЙ СИНДРОМ

Результати досліджень кровотворення *in vitro* забезпечили протягом останніх трьох-чотирьох десятиліть більшу частину знань про організацію, регулювання та розвиток системи кровотворення людини. Проте, через неможливість відповідної оцінки гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) на людині та через недоліки методологічних підходів, для визначення ролі гемопоетичних клітин-попередників у патогенезі мієлодиспластичного синдрому і прогнозування перебігу патологічного процесу було використано напіврідкі агарові культури кісткового мозку пацієнтів з мієлодиспластичним синдромом. Мієлодиспластичний синдром (МДС) належить до клінічно, морфологічно, генетично гетерогенної групи захворювань, що характеризується клональністю та виникає унаслідок мутації на рівні гемопоетичних клітин-попередників. Проліферація такого мутованого попередника стовбурової клітини призводить до неефективного дозрівання клітин мієлоїдного паростка та диспластичних змін у кістковому мозку (КМ). Метою дослідження було встановлення взаємозв'язку функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників у культурі *ex vivo* та активності патологічного процесу при мієлодиспластичному синдромі. Досліджували зразки кісткового мозку пацієнтів, хворих на мієлодиспластичний синдром, а саме рефрактерну анемію з надлишком бластів I (МДС РАНБ I) та рефрактерну анемію з надлишком бластів II (МДС РАНБ II) і ГМЛ за умов двотижневого культивування *in vitro*, а також їхні клініко-лабораторні дані. Було встановлено, що відсоток бластів і мієлобластів у зразках хворих на ГМЛ та МДС РАНБ II збільшувався в порівнянні зі зразками хворих на МДС РАНБ I (63,5±39 %, 18,05±1,01 % та 9,49±1,53 % відповідно). Спостерігали збільшення показників кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну в групі пацієнтів з МДС РАНБ I у порівнянні з МДС РАНБ II (2,9±1,4×10¹²/л і 105,04±3,6 г/л проти 9±0,8×10¹²/л і 84,5±4,8 г/л відповідно). Аналіз результатів досліджень КМ хворих на МДС у культурі *in vitro* свідчив про значне відставання у формуванні клітинних агрегатів упродовж культивування і виражене пригнічення колонієутворюючої здатності клітин-попередників у порівнянні з контролем. Спостерігали помітне зниження колонієутворюючої здатності у пацієнтів з МДС РАНБ I, МДС РАНБ II та ГМЛ у такій послідовності: 4,1±1,2 на 1×10⁵ експлантованих клітин, 3,2±0,9 на 1×10⁵ експлантованих клітин та 2,0±0,6 на 1×10⁵ експлантованих клітин відповідно. Проведений аналіз гематологічних показників та результатів культивування клітин КМ на різних етапах перебігу МДС свідчить, що здатність до колонієутворення клітин-попередників корелює з глибиною патологічного процесу.

Ключові слова: мієлодиспластичний синдром, стовбурова клітина, гемопоез, культура *in vitro*.

Вступ

На сьогодні положення про те, що лейкемія є захворюванням стовбурових клітин, не викликає сумніву [1]. Також існують роботи, які свідчать, що компартмент клітин-попередників відіграє значну роль у дотримуванні та прогресії лейкемічного процесу [2,3]. Експериментальні дослідження, присвячені вивченню гемопоезу миші та людини, показали, що лейкемічні стовбурові клітини беруть початок від трансформованих прогеніторних клітин. Вони виявляють здатність до самопідтримки, мають функціональну

активність, яка зазвичай нехарактерна для клітини-попередника у нормі та є ключовою ознакою цієї стовбурової клітини.

Крім того, встановлена ампліфікація клітин у компартменті попередників пов'язана з підвищенням здатності до самопідтримки на рівні клітин-попередників (GM-CSF), що свідчить на користь концепції, яка не виключає походження лейкемічних клітин від стовбурової, ініційованої клітинами-попередниками.

Зазвичай лейкемічний ріст вивчають у культуральному середовищі з напіврідкого агару або метилцелюлози [4]. Цей тип культури, у якій

використовується агар або метилцелюлоза як матрикс, базується на здатності гемопоетичних клітин-попередників до проліферації і дає ріст більш зрілим клітинам, які розміщуються в безпосередній близькості одна до одної, формуючи колонії [5]. Проте немає вичерпних даних про особливості їх функціонування у хворих із різним ступенем ризику трансформації МДС у гостру лейкемію.

Метою дослідження було встановлення взаємозв'язку функціональної активності гемопоетичних клітин-попередників у культурі *ex vivo* та активності патологічного процесу при мієлодиспластичному синдромі.

Матеріали та методи дослідження

У роботі проаналізовано дані хворих на МДС, які перебували на лікуванні або на обстеженні у відділенні захворювань системи крові та в консультативній поліклініці ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України» в першому та другому відділеннях Київської міської клінічної лікарні № 9. Загалом у дослідження увійшло 29 хворих на МДС, із них у групу первинно верифікованого МДС РАНБ I включено 16 пацієнтів, у групу з первинно діагностованим МДС РАНБ II – 11 осіб та 2 пацієнти з ГМЛ, що трансформувалися з МДС. Оскільки поширеність підтипів захворювання відрізняється між собою, кількість хворих у кожній групі, включених у дослідження, неоднакова.

Для встановлення діагнозу поряд з клінічними даними враховували результати цитоморфологічних досліджень периферичної крові з визначенням вмісту гемоглобіну, кількості еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів та підрахунком лейкограми у забарвлених мазках за методом Май-Грюнвальда – Гімзи. Спеціальні гематологічні дослідження склались із цитоморфологічного дослідження КМ, отриманого шляхом проведення стерильної пункції з підрахунком мієлограми та оцінкою диспластичних змін гемопоєзу. Загалом верифікацію діагнозу МДС РАНБ I та РАНБ II, а також ГМЛ, що трансформувалися з МДС, проводили відповідно до ВООЗ критеріїв мієлоїдних неоплазій та гострих лейкемій 2008 р.

Для визначення активності колонієутворення застосовували культивування в умовах *in vitro*. Кістковий мозок у кількості 1 мл транспортували в лабораторію за температури 0 °С. Зразок розводили у співвідношенні 1:3 з розчином PBS (Sigma-Aldrich, США) та нашаровували на Histopaque (Gibco, США) щільністю 1,077 г/мл,

центрифугували протягом 30 хв за 740 g. З отриманого зразка виділяли фракцію моноклеарів та тричі відмивали шляхом центрифугування протягом 10 хв за 430 g у розчині PBS. Очищену фракцію розводили у середовищі DMEM (Sigma, США) та здійснювали підрахунок клітин меланжерним методом у камері Горяєва.

Потім клітини культивували в середовищі DMEM (Sigma, США) з додаванням 20 % FBS (Sigma, США), 1 % антибіотиків (пеніцилін/стрептоміцин) та L-глутаміну (Sigma, США), 50 нг гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора (PeproTech, США) та 3,3 % агару (Difco, США) за умов абсолютної вологості, 5 % CO₂ та 37 °С протягом 14 діб. Підрахунок отриманих клітинних агрегатів здійснювали під інвертованим мікроскопом (Olympus CK-2, Японія).

Для оброблення результатів використовували статистичну програму Microsoft Excel. Достовірність відмінностей середніх значень двох сукупностей визначали із застосуванням U-критерію Манна – Уїтні; різницю результатів вважали достовірною на рівні значущості 95 % (p < 0,05).

Результати та їх обговорення

Золотим стандартом оцінки стану кісткового мозку при онкологічних гематологічних захворюваннях залишається цитологічне дослідження кісткового мозку та периферичної крові [6,7]. Таке дослідження не лише є найпростішим способом підтвердити кількісні зміни, що виникають у процесі розвитку онкологічного гематологічного захворювання у системі кровотворення, але й дає змогу проводити моніторинг стану системи гемопоєзу протягом періоду лікування. Проведено аналіз цитоморфологічних даних та здатності до утворення колоній клітинами-попередниками КМ у культурі *in vitro* 29 хворих на МДС РАНБ I, МДС РАНБ II та ГМЛ, що трансформувалися з МДС.

Під час аналізу показників периферичної крові (ПК) виявлено більшу кількість еритроцитів $2,9 \pm 1,4 \times 10^{12}/л$ та вміст гемоглобіну $105,04 \pm 3,6$ г/л у хворих на МДС РАНБ I, ніж у пацієнтів із МДС РАНБ II – еритроцити $1,9 \pm 0,8 \times 10^{12}/л$, гемоглобін $84,5 \pm 4,8$ г/л (p < 0,05). Показники лейкоцитів $1,5 - 1,2 \pm 0,5 \times 10^9/л$ та тромбоцитів $54,6 - 68,3 \pm 10,4 \times 10^9$ були зниженими в обох групах обстежуваних хворих.

Водночас у лейкограмі хворих на МДС РАНБ I виявлено більшу кількість мієлоцитів $7,9 \pm 0,6$ % порівняно з відповідним показником у хворих на МДС РАНБ II $3,1 \pm 0,5$ % (p < 0,05).

Натомість у хворих на МДС РАНБ II та ГМЛ на момент верифікації діагнозу в лейкограмі виявлено більшу кількість бластів – $12,5 \pm 1,5$ % та $26,4 \pm 3,5$ % і промієлоцитів – $9,5 \pm 1,3$ % та $11,4 \pm 1,4$ % ($p < 0,05$), ніж у хворих із МДС РАНБ I.

У показниках мієлограми в групах хворих із МДС РАНБ II та ГМЛ, що трансформувалася з МДС, встановлено більше середнє значення відсотка бластів та мієлобластів у порівнянні з відповідними показниками при МДС РАНБ I (див. таблицю).

Перші колонії (агрегати понад 40 клітин) з'явилися на 5–7-му добу культивування. Далі відбувалось збільшення кількості колоній, максимальна їх кількість спостерігалась на 14-ту добу культивування. Виділяли три типи колоній, що виявлялись у культурі незалежно від тривалості інкубування: компактні колонії, дифузні колонії та дифузні з вінчиком. При цьому клітини в колоніях були розташовані в декілька рядів, тобто колонії були об'ємними, росли як у горизонтальній, так і у вертикальній площині. Клітини, що склали колонії, мали округлу форму та однакові розміри.

Таблиця. Окремі показники мієлограми у хворих на МДС РАНБ I, РАНБ II та ГМЛ, що трансформувалася з МДС

Показники	МДС РАНБ I n 16 (%)	МДС РАНБ II n 11 (%)	ГМЛ n 2 (%)	P
Бласти* та мієлобласти, %	$9,49 \pm 1,53$	$18,05 \pm 1,01$	$63,5 \pm 39^*$	0,001
Промієлоцити, %	$6,52 \pm 0,5$	$5,08 \pm 0,5$	$8,55 \pm 1,5$	0,05
Мієлоцити, %	$8,87 \pm 1,01$	$6,16 \pm 0,5$	$6,52 \pm 0,5$	0,05

У більшості обстежуваних хворих на МДС клітинність КМ була підвищена, переважно за рахунок клітин еритроїдного ряду з наявністю мегалобластоїдних форм і мегакаріоцитарного паростка, клітини якого були представлені у вигляді мікроформ, траплялися голоядерні і багоядерні форми. Збільшення кількості клітин гранулоцитарного паростка спостерігали у 17 пацієнтів. Крім того, виявляли присутність незрілих форм і розташування їх у центральних відділах кісткомозкових порожнин, що не є характерним для нормального гемопоєзу, а є підтвердженням МДС [8,9].

Оскільки специфічних параметрів культивування стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку в напіврідкому агарі саме для пацієнтів із МДС на сьогодні не встановлено, метою наступного дослідження було вивчити кінетичні особливості утворення колоній і кластерів клітинами кісткового мозку при культивуванні в напіврідкому середовищі *in vitro* на 3-тю, 5-ту, 7-му, 9-ту, 12-ту, 14-ту та 17-ту добу культивування і встановити оптимальну тривалість культивування для проведення подальших досліджень.

Задля досягнення поставленої мети в зазначені терміни інкубації проводили підрахунок утворених клітинних агрегатів під інвертованим мікроскопом Olympus SK-2 із використанням збільшення $\times 100$.

Перші агрегати, що склались із 3–6 клітин, виявляли на 3-тю добу культивування. Такі скупчення клітин надалі збільшувались у розмірах із продовженням терміну інкубування та склались з округлих клітин однакового розміру. Спостерігали появу як компактних, так і дифузних клітинних агрегатів уже на перших етапах культивування.

Кількість кластерів із 5–6-ї доби, тобто з першого дня появи колоній, зменшувалась, на 12–14-ту добу їхня чисельність стабілізувалась. Імовірно, частина клітинних агрегатів у результаті проліферації утворювала колонії, а нові кластери на цей час уже не утворювалися. Розмір колоній збільшувався до 12–14-ї доби, кількість клітин у них коливалася від 40 до 200. На 17-ту добу клітини в колоніях розташовувались менш компактно, кожна колонія була оточена дифузним вінчиком клітин.

Результати проведених досліджень показали, що кількість клітинних агрегатів різного типу (колоній та кластерів) стабілізувалась та не змінювалась. Саме тому обрахунок результатів під час проведення подальших досліджень здійснювали на 14-й день після початку культивування.

З метою дослідження морфологічного складу колоній насамперед вивчали культури кісткового мозку здорових осіб, який вилучали з фрагментів ребер. Після отримання колоній на 14-й день культивування і визначення їх кількості з розрахунку 1×10^5 експлантованих клітин ми вилучали їх індивідуально мікропіпетками варіабельного об'єму, виготовляли препарати за допомогою цитоцентрифуги Cytospin-3, забарвлювали їх за методом Папенгейма та вивчали під світловим мікроскопом з імерсійним збільшенням $\times 1000$.

Аналіз клітинного складу колоній показав, що вони представлені ядровмісними клітинами округлої форми. Забарвлені колонії вивчали з метою встановлення типів клітин, які складають клітинні агрегати. У центрі колоній розміщувалися більш молоді клітини, по мірі віддалення до периферії розміщувалися все більш

диференційовані клітинні елементи, могли з'являтися метамієлоцити, паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли та еозинофіли. Із збільшенням терміну культивування навколо центру компактних колоній спостерігалась поява «вінчика» з дифузно розташованих клітин та все більш поступове віддалення більш зрілих гранулоцитарних клітин від центру колонії. Також виявляли зростання кількості макрофагальних та апоптотичних клітин в останні дві доби культивування.

Отже, ми встановили кінетичні показники утворення клітинних агрегатів клітинами-попередниками кісткового мозку пацієнтів у нормі в напіврідкому середовищі *in vitro*. У всіх наступних дослідженнях розрізняли два основні типи клітинних агрегатів: колонії (колонієутворюючі одиниці, КУО) та кластери (кластероутворюючі одиниці, КлУО), кількість яких підраховували окремо для кожного зразка. Виявили стабілізацію кількості КУО та КлУО, утворених у напіврідкому агарі, саме на 14-ту добу культивування, тому в подальших дослідженнях цей термін культивування вважали оптимальним. Кількість клітин, визначена як оптимальна для проведення подальших досліджень, становила 2×10^5 клітин в 1 мл, або 1×10^5 клітин в одній лунці культурального планшета.

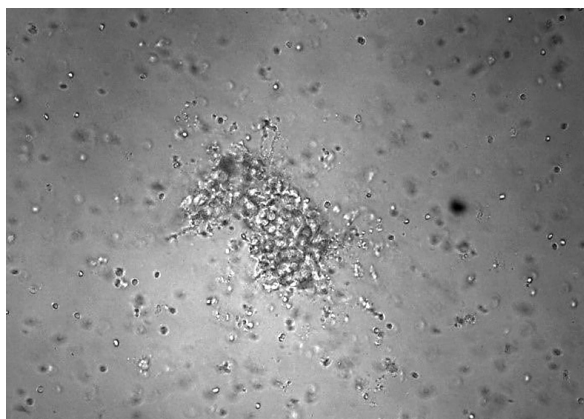
Аналіз результатів досліджень КМ хворих на МДС свідчив про значне відставання у формуванні клітинних агрегатів упродовж культивування і виражене пригнічення колонієутворюючої здатності клітин-попередників у порівнянні з контролем, а саме клітинами КМ з фрагментів ребер, отриманих у здорових донорів, що оперувались з приводу травматичних ушкоджень. Було виявлено колонії в кількості $37,4 \pm 2,3$ на 1×10^5 експлантованих клітин та $4,5 \pm 2,1$ на 1×10^5 експлантованих

клітин відповідно для зразків здорового та патологічного кісткового мозку. Залежно від активності патологічного прояву показники колонієутворення знижувалися в такій послідовності: МДС РАНБ I > МДС РАНБ II > ГМЛ. Тобто було виявлено такі кількості клітинних агрегатів: $4,1 \pm 1,2$ на 1×10^5 експлантованих клітин, $3,2 \pm 0,9$ на 1×10^5 експлантованих клітин та $2,0 \pm 0,6$ на 1×10^5 експлантованих клітин відповідно.

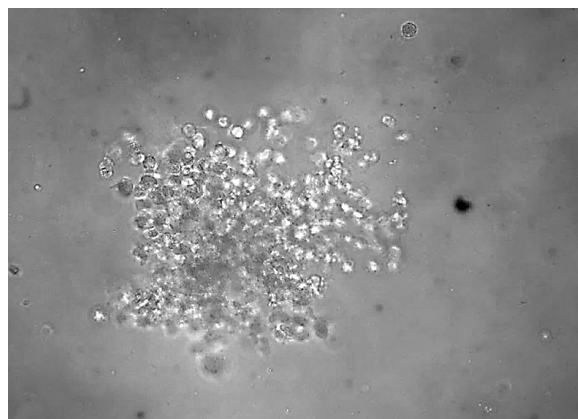
Важливо зазначити, що отримані клітинні агрегати мали примхливу форму та фібробластоподібні клітини у своєму складі за відсутності відповідних змін у клітинах донорського КМ, що продемонстровано на рисунку. Такі дані свідчать на користь патологічних змін кровотворення у зразках хворих на МДС [5,10].

Висновки

Отже, встановлено кінетичні показники колонієутворення клітин-попередників кісткового мозку за нормальних умов кровотворення і мієлодиспластичного синдрому. Визначено оптимальний термін підрахунку результатів культивування. Показано найбільш припадну концентрацію клітин для культивування в напіврідкому агарі. Проведений аналіз гематологічних показників та результатів культивування клітин КМ на різних етапах перебігу МДС свідчить, що здатність до колонієутворення клітин-попередників корелює з глибиною патологічного процесу. Збільшення кількості бластів та мієлобластів у мієлограмі пацієнтів перебуває в оберненій залежності від кількості утворених у результаті культивування клітинних агрегатів, що пов'язано з дисфункцією гемопоетичних стовбурових клітин і їхніх найближчих нащадків – клітин-попередників.



a



b

Рисунок. Колонії гемопоетичних клітин-попередників у культурі кісткового мозку *in vitro*: a – колонія зі зразка хворого на МДС; b – колонія зі зразка здорової особи. Збільшення $\times 200$

Список літератури

- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2012 Sep;120(12):2454–65.
- Rouault-Pierre K, Smith AE, Mian SA, Pizzitola I, Kulasekararaj AG, Mufti GJ, Bonnet D. Myelodysplastic syndrome can propagate from the multipotent progenitor compartment. *Haematologica*. 2017 Jan;102(1):e7–e10.
- Braham MVJ, Li Yim ASP, Mateos JG, Minnema MC, Dhert WJA, Öner FC, Robin C, Alblas J. A Human Hematopoietic Niche Model Supporting Hematopoietic Stem and Progenitor Cells *In Vitro*. *Adv. Healthcare Mater*. 2019 Apr;8(10):1801444.
- Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Guerrero-Rivera S, Pizzuto-Chavez J, Mayani H. Hematopoietic progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: *in vitro* colony growth and long-term proliferation. *Leukemia research*. 1999 Apr;23:385–94.
- Li B, Liu J, Qu S, Gale RP, Song Z, Xing R, Liu J, et al. Colony-forming unit cell (CFU-C) assays at diagnosis: CFU-G/M cluster predicts overall survival in myelodysplastic syndrome patients independently of IPSS-R. *Oncotarget*. 2016 Sep;7(42): 68023–32.
- Gluzman DF, Sklyarenko LM, Koval SV, Ivanovskaya TS, Zavelevich MP, Philchenkov AA, Polischuk AS, Rodionova NK. Modern classification and diagnosis of myelodysplastic syndromes. Scientific-and-methodical guide. Kyiv: Interservis; 2018.
- Dezern AE, Sekeres MA. The Challenging World of Cytopenias: Distinguishing Myelodysplastic Syndromes From Other Disorders of Marrow Failure. *The Oncologist*. 2014 May; 19:735–45.
- Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, del Cañizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013 Oct;122(17):2943–64.
- Coutinho LH, Geary G, Chang J, Harrison C, Testa NG. Functional studies of bone marrow haemopoietic and stromal cells in the myelodysplastic syndrome (MDS). *British Journal of Haematology*. 1990 Dec;75:16–25. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1990.tb02611.x
- Pakharenko M, Bilko D, Tretiak N, et al. Functional activity of hematopoietic progenitor cells in myelodysplastic syndrome *in vitro*. *NaUKMA Research Papers. Biology and Ecology*. 2020;3:48–52. DOI: 10.18523/2617-4529.2020.3.48-52

D. Bilko, M. Pakharenko, N. Bilko

THE ABILITY OF BONE MARROW PROGENITOR CELLS TO FORM COLONIES IN *EX VIVO* CULTURE OF MDS PATIENTS

The results of *in vitro* hematopoiesis studies have provided most of the knowledge about the organization, regulation, and development of the human hematopoietic system over the past three to four decades. However, due to the impossibility of an appropriate assessment of hematopoietic stem cells (HSC) in humans and because of the shortcomings of methodological approaches to determining the role of hematopoietic progenitor cells in the pathogenesis of MDS and to predicting the course of the pathological process, semi-liquid agar cultures of bone marrow from patients with myelodysplastic syndrome were used. Myelodysplastic syndrome (MDS) refers to a clinically, morphologically, and genetically heterogeneous group of diseases characterized by clonalism and arising from mutations at the level of hematopoietic progenitor cells. Proliferation of such a mutated stem cell progenitors leads to ineffective maturation of myeloid lineage cells and dysplastic changes in the bone marrow (BM). The aim of the study was to establish the relationship between the functional activity of hematopoietic progenitor cells in the *ex vivo* culture and the activity of the pathological process in the myelodysplastic syndrome. We studied bone marrow samples from patients with the myelodysplastic syndrome, namely refractory anemia with excess blasts I (MDS RAEB I) and refractory anemia with excess blasts II (MDS RAEB II) and AML under conditions *in vitro*, as well as their clinical laboratory data. It was found that the percentage of blasts and myeloblasts in the samples of patients with AML and MDS RAEB II increased, compared to the samples of patients with MDS RAEB I (63.5±3.9 %, 18.05±1.01 % and 9.49±1.53 % respectively). An increase in the number of erythrocytes and hemoglobin content was noted in the group of patients with MDS RAEB I compared with MDS RAEB II (2.9±1.4×10¹² / l and 105.04±3.6 g / l versus 9±0.8×10¹² / l and 84.5±4.8 g / l, respectively). The analysis of the results of BM studies of patients with MDS in *in vitro* culture indicated a significant lag in the formation of cell aggregates during cultivation and a pronounced inhibition of the colony-forming ability of progenitor cells, compared to the control. A noticeable decrease in the colony-forming ability was observed in patients with MDS RAEB I, MDS RAEB II and AML in this sequence – 4.1±1.2 per 1×10⁵ explanted cells, 3.2±0.9 per 1×10⁵ explanted cells and 2.0±0.6 per 1×10⁵ explanted cells, respectively. The analysis of hematological parameters and the results of BM cells cultivation at different stages of MDS indicates that the colony-forming ability of progenitor cells correlates with the depth of the pathological process.

Keywords: myelodysplastic syndrome, stem cell, hematopoiesis, *in vitro* culture.



Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)

Матеріал надійшов 23.04.2021